

ВЫДЕЛЕНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ИЗ ГРИБОВ РОДА *ASPERGILLUS*

Е.О. ЮРЧЕНКО

Полесский государственный университет
г. Пинск, Республика Беларусь, eugene_yu@tut.by

Aspergillus представляет собой один из самых больших и разнообразных родов грибных организмов. Согласно базе данных *Index Fungorum* (2014), к этому роду причисляется 556 видовых названий, из которых 382 имеют таксономическое мнение «принятые названия», т.е. устоявшиеся виды (*Species Fungorum*, 2014). В истории промышленного использования грибов аспергиллы имели, и по сей день имеют большое значение при производстве соевого соуса, в частности, *A. flavus* var. *oryzae* [syn.: *A. oryzae*] (Rai, 2009). Крупной вехой в истории производства ферментов был препарат Taka-diastase, получаемый из того же гриба (Oshima, 1928). Из всего разнообразия видов аспергиллов протеолитические ферменты изучались, главным образом, у *A. awamori* (Negi & Banerjee, 2009; Negi & al., 2011), *A. flavus* (Muthulakshmi & al., 2011), *A. flavus* var. *oryzae* (Oshima, 1928; Hong & al., 2006; Chellapandi, 2010; Murthy & Naidu, 2010; Chancharonpong & al., 2012), *A. fumigatus* (Monod & al. 1991; Neustadt & al., 2009; Hernández-Martínez & al., 2011; Watson & al., 2011), *A. nidulans* (Charles & al., 2008), *A. niger* (Devi & al., 2008; Mukhtar & Haq, 2009; Gnanadoss & al., 2011; Madhumithah & al., 2011; Kalaskar & al., 2012; Rebecca & al., 2012; Yin & al., 2013; Abidi & al., 2014; Munawar & al., 2014), *A. ochraceus* (Klöcking & Markwardt, 1975) и *A. terreus* gr. (Chellapandi, 2010; Hussain & al., 2010; Niyonzima & More, 2014; Osman & al., 2014).

Предлагается применять протеазы аспергиллов как пищевую добавку для размягчения мяса (Calkins & Sullivan, 2007), для получения гидролизатов отходов мясной промышленности (Hussain & al., 2010), как компоненты моющих средств для устранения загрязнений белковой природы (Niyonzima & More, 2014), в качестве компонентов лекарств для регуляции образования нежелательных белков (Kalaskar & al., 2012).

Очистка фермента по окончании культивирования гриба выступает ключевым технологическим этапом получения протеаз. Целью настоящего мини-обзора является обобщение сведений о процессе препарирования протеаз аспергиллов на лабораторном уровне. В тексте используются сокращения: СА – сульфат аммония, ТНС – Tris-HCl буфер.

Исходные штаммы–продуценты рекомендуется выделять из мест скопления белковых отходов (Chellapandi, 2010). Культивирование аспергиллов для получения ферментов может вестись как погруженным способом, так и твердофазно. Получение протеазы включает этапы, охарактеризованные ниже.

1а. Отделение плотной фазы при погруженном культивировании. По общепринятому мнению, протеазы аспергиллов продуцируются экстрацеллюлярно, поэтому при выращивании в жидкой фазе первоначально получают неочищенный экстракт фермента (crude enzyme extract), отделяя мицелий и конидии гриба фильтрованием. Применяют фильтровальную бумагу Whatman No.1 (Radha & al., 2011; Rebecca & al., 2012), Whatman No.44 (Mukhtar & Haq, 2009), хлопковую ткань (Negi & al., 2011), муслиновую ткань (Gnanadoss & al., 2011), бумажную ткань (Monod & al., 1991). Затем фильтрат центрифугируют 15–20 мин при 4°C и 10000 об/мин (Chellapandi, 2010; Abidi & al., 2014; Osman & al., 2014), отбирая для дальнейшей очистки надосады. Возможно центрифугирование без предварительного фильтрования, в течение 10 мин при 4°C и 10000 об/мин (Niyonzima & More, 2014). Предлагается также центрифугирование культуры (5 мин при 4°C и 4500 об/мин) с последующей фильтрацией надосады через стерильный фильтр Miracloth (Watson & al., 2011).

1б. Экстракция при твердофазном культивировании. При выращивании на плотных субстратах, как, например, отруби, экстрагирование ферментов проводят дистиллированной водой, раствором Tween-80, фосфатным буфером. Показана также возможность экстракции ферментов 10% водным раствором глицерина (Negi & al., 2011). Экстракция фермента водой применялась еще «на заре» препаративной биохимии (Oshima, 1928). Дистиллированную воду добавляют к продуктам культивирования в соотношении 3.33 : 1, с последующим взбалтыванием на шейкере 1 ч при 200 об/мин (Osman & al., 2014). Как варианты известны следующие протоколы: к 20 г продукта добавляют 40 мл дистиллированной воды и взбалтываются на шейкере 1 ч при 200 об/мин (Mukhtar & Haq, 2009); к 20 г продукта добавляют 100 мл дистиллированной воды и взбалтывают.

ся на шейкере 2 ч (Muthulakshmi & al., 2011). Другой метод заключается в добавлении к продуктам твердофазного культивирования (16 г) 0.1% Tween-80 (25 мл) и взбалтывании на шейкере 1 ч при 150 об/мин (Munavar & al., 2014). Как разновидность метода предлагается добавление к 2 г продукта 10 мл 0.1% Tween-80 и взбалтывание на шейкере 1 ч при 180 об/мин (Madhumithah & al., 2011). Продукты культивирования могут быть смешаны с 0.1 М фосфатным буфером pH 6.9 в соотношении 1 : 2 (w/v) и выдержаны 30 мин в шейкер-инкубаторе, 150 об/мин при 30°C (Chancharoonpong & al., 2012).

После взбалтывания на шейкере экстракт центрифугируют 10–15 мин при 5000–8000 об/мин (для воды и Tween-80) или 10000 g (для воды и фосфатного буфера), оставляя надосадок, содержащий фермент (Madhumithah & al., 2011; Muthulakshmi & al., 2011; Chancharoonpong & al., 2012; Munavar & al., 2014; Osman & al., 2014). Центрифугирование проводят, как правило, при 4°C.

При оценке протеазной активности по показателям гидролиза казеина в простых вариантах эксперимента может быть применен неочищенный экстракт фермента – ‘cell-free broth’ (Negi & Banerjee, 2006; Devi & al., 2008; Madhumithah & al., 2011; Chancharoonpong & al., 2012), либо фильтрат культуральной жидкости (Mukhtar & Haq, 2009; Gnanadoss & al., 2011; Radha & al., 2011; Rebecca & al., 2012). Экстракт хранят при 4°C. Рекомендуются оценивать его активность в течение первых 5–ти дней хранения (Watson & al., 2011).

2а. Высаливание белка. Общий белок осаждают высаливанием по Диксону и Веббу (Dixon, Webb, 1964). К надосадку добавляют кристаллический СА в следующих количествах количестве от полного насыщения раствора: 50% (Kalaskar & al., 2012), 54% (Chellapandi, 2010), 70% (Muthulakshmi & al., 2011; Munawar & al., 2014), 80% (Devi & al., 2008; Abidi & al., 2014), 90% (Monod & al., 1991). Отмечается, что 90% СА осаждает 95% фермента (Hussain & al., 2010).

Предлагается добавлять СА к прозрачному надосадку постепенно, при 4°C и плавном перемешивании (Muthulakshmi & al., 2011; Munawar & al., 2014). Высаливание может вестись и при 20°C (Monod & al., 1991; Kalaskar & al., 2012). Выпавший в осадок белок собирают центрифугированием 20–30 мин при 4°C и 7000–10000 об/мин (Abidi & al., 2014; Osman & al., 2014) или 30 мин при 20000 об/мин (Munawar & al., 2014).

2б. Другие способы осаждения белка. В одном из ранних протоколов предлагается осаждение белка добавлением 4-х объемов этанола к водной вытяжке, с последующей сушкой осадка при низкой температуре (Oshima, 1928).

При ацетоновой преципитации фильтрат смешивают с ацетоном в соотношении 1 : 2 (v/v) и выдерживают в течение 1 ч при 4°C. Осадок отделяют центрифугированием 30 мин при 4°C и 10000 g. Собранный фермент концентрируют (Negi & al., 2011). В разновидности этого протокола к одному объему надосадка культуральной жидкости медленно добавляется 3 объема холодного (–20°C) ацетона, смесь инкубируется 3 ч при –20°C. Осадок собирается центрифугированием 10 мин при 13000 об/мин (Niyonzima & More, 2014).

3. Растворение белка. Полученный белок растворяют в буфере Tris-HCl либо фосфатном буфере. Используют минимальный объем буфера: 20 mM THC с pH 8.0 (Abidi & al., 2014), 25 mM THC с pH 8.0 (Munawar & al., 2014), 50 mM THC с pH 6.5 (Negi & al., 2011), 0.1% THC с pH 9.0 (Devi & al., 2008), THC с pH 5.0 (Kalaskar & al., 2012). После ацетонового осаждения предлагается растворять осадок в минимальном объеме 0.1 М THC с pH 9.0, с последующей лиофилизацией до состояния порошка (Niyonzima & More, 2014).

Фосфатный буфер для растворения берут с pH 7.0 и в концентрации 0.05 М (Osman & al., 2014) или 0.1 М (Murthy & Naidu, 2010). Один из методов предусматривает растворять осажденный белок в 1/150 исходного объема дистиллированной воды, с последующим отделением нерастворенной фракции центрифугированием 5 мин при 5000 g и диализом растворенной фракции против THC (Monod & al., 1991).

4. Диализ растворенного белка. Диализ проводят в мешочке из пористой мембраны, погруженном в буфер малой ионной силы (Nigam & Ayuagari, 2007: 113–114). Растворенный в буфере белок подвергают диализу против того же самого буфера, в котором он был растворен (Devi & al., 2008), либо концентрируют диализом против раствора сахарозы (Osman & al., 2014). Диализ в THC или фосфатном буфере ведут при 4°C, в течение 4 ч (Monod & al., 1991), 12 ч (Kalaskar & al., 2012; Munawar & al., 2014), 24 ч (Muthulakshmi & al., 2011), 24 ч с шестикратной заменой буфера (Murthy & Naidu, 2010). После диализа раствор фермента опционально подвергают концентрации (Munawar & al., 2014), лиофилизации (Hussain & al., 2010), либо ультрафильтрации в системе Ultracent-30 (Bio-Rad), которая уменьшает объем раствора до 5 мл (Monod & al., 1991). Диализи-

рованный препарат фермента можно применять для оценки его протеазной активности (Kalaskar & al., 2012).

5. Разделение белков гелевой фильтрацией. Гелевая фильтрация ведется в системе быстрой жидкостной хроматографии белков (FPLC) на колонках: Sephadex G-75 (Hussain & al., 2010); Sephadex G-100 36×1.6 см, 70×2 см, 90×2.6 см; Sephadex G-150 90×2.6 см (Charles & al., 2008; Murthy & Naidu, 2010; Abidi & al., 2014; Osman & al., 2014). Колонку предварительно уравнивают тем же буфером, в котором был растворен белок. Диализированный препарат наносят в колонку в количестве 3 мл. Элюцию производят тем же буфером, которым уравнивали колонку. При скорости потока через колонку 40 мл/ч собирают 60 фракций по 5 мл каждая, для колонки 70×2 см (Osman & al., 2014), либо при скорости потока 30 мл/ч собирают фракции объемом по 2 мл, для колонки 90×2.6 см (Abidi & al., 2014). Гель-фильтрация возможна также в колонке Sephacryl S-100 HR (Yin & al., 2013) или в колонке полиакриламидного геля Р 60, с элюированием в среде 20 mM TCH pH 8.0 (Monod & al., 1991).

6. Тестирование фракций на протеолитическую активность. Полученные в ходе гель-фильтрации фракции тестируют на способность вызывать протеолиз. Как правило, используется казеинолитический метод. Гидролиз казеина оценивается спектрофотометрически (Abidi & al., 2014). Помимо протеолитической активности, в каждой фракции спектрофотометрически определяется содержание белка по оптической плотности, т.е. по поглощению излучения с $\lambda=280$ нм. Протеазная активность фракций может оцениваться более дорогостоящим методом с помощью флуоресцентно-меченых репортерных пептидов (Neustadt & al., 2009).

7. Получение конечного препарата протеазы после гель-фильтрации. «Пиковые» одновременно по протеазной активности и содержанию белка фракции сливают вместе. В частности, в эксперименте Abidi & al. (2014), «пиковыми» были фракции 53–58 из общего числа фракций 86. Итоговый раствор может быть в дальнейшем сконцентрирован. При необходимости, кристаллизация очищенного фермента производится методом диффузного испарения висячей капли, с использованием PEG 6000 как осадителя (Charles & al., 2008).

8а. Выделение белка ионообменной хроматографией. При необходимости более высокой очистки протеазы, после гель-фильтрации проводят дополнительно ионообменное хроматографическое фракционирование препарата. Для этого используют колонки: DEAE-C 25×2 см (Devi et al., 2008), DEAE-C 30×1 см (Osman & al., 2014), DEAE-FF-Sephacrose 2.6×10 см (Abidi & al., 2014), CM Sepharose FF (Yin & al., 2013). Колонку DEAE-C предварительно уравнивают 0.05 М фосфатным буфером с pH 7.0. Колонку DEAE-FF-Sephacrose уравнивают 20 mM TCH с pH 8.0. Сверху на колонку наносят 3 мл сконцентрированного раствора объединенных фракций. Колонку промывают тем же буфером, которым она была подготовлена, для элюции несвязанных белков. Затем связанные белки элюируются в линейном градиенте 0–0.4 М или 0–0.5 М NaCl в уравнивающем буфере: при скорости потока 20 мл/ч собираются фракции по 3 мл (Muthulakshmi & al., 2011), при скорости потока 30 мл/ч собирают 60 фракций по 5 мл (Osman & al., 2014), либо при скорости потока 45 мл/ч собирают фракции по 3 мл (Abidi & al., 2014). Может также применяться скорость потока 15 мл/ч (Devi et al., 2008). Для элюции может применяться буфер, содержащий 0.2 М NaCl (Murthy & Naidu, 2010).

Хроматография на DEAE-целлюлозной колонке может проводиться без предварительного этапа гель-фильтрации. Колонка предварительно уравнивается тем же буфером, против которого диализовался осажденный СА белок.

Ионообменная хроматография может предшествовать гель-фильтрации. Используется порошок CM Sephadex, которым наполняют колонку 20×2 см и уравнивают 10 mM TCH с pH 6.5. На колонку наносят 2 мл экстракта. Несвязанный белок вымывается 50 mM TCH с pH 7.0. После такого промывания колонки производится дальнейшая элюция в градиенте 0.5 М NaCl в непрерывном режиме (Negi & al., 2011).

8б. Другие методы фракционирования. Для очистки фермента, осажденного ацетоном и лиофилизированного, предлагается аффинная хроматография в агарозе, связанной с лектином Con A, в колонке 9×0.5 см, уравненной тем же буфером, в котором растворялся белок до лиофилизации. Порошок фермента растворяется в этом же буфере и наносится на колонку. Собираются фракции связанных и несвязанных белков. Связанные белки вымываются буфером с 1 М сахарозой (Niyonzima & More, 2014). Фракционирование культурального надосадка может производиться также методом свободно-проточного электрофореза (Neustadt & al., 2009).

9. Получение конечного препарата протеазы после ионообменной хроматографии. Фракции, показывающие протеолитическую активность, объединяются вместе. Согласно эксперимен-

там, протеаза содержалась во фракциях 5–7 из общего числа выделенных фракций 25 (Negi & al., 2011), во фракциях 30–34 из общего числа 45 (Abidi & al., 2014), во фракциях 4–14 при общем количестве фракций 71 (Osman & al., 2014). Объединенные фракции хранят при 4°C. Они могут быть подвергнуты лиофилизации (Munavar & al., 2014), либо диализу против сахарозы с последующей концентрацией.

Выход целевой протеазы после всех стадий очистки невелик. Препарат очищенного фермента составляет от 0.2% (Osman & al., 2014) до 3.6% (Abidi & al., 2014) по массе от общего белка в надосадке после центрифугирования культуральной жидкости.

10. Оценка чистоты препарата с помощью электрофореза. Контроль чистоты объединенных фракций проводят путем денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле с ДСН (SDS–PAGE). При этом степень очистки обозначают как «электрофоретическую гомогенность» (Yin & al., 2013), т.е. фермент наблюдается в виде единственной полосы (Charles & al., 2008; Abidi & al., 2014). Как отмечается (Hussain & al., 2010), электрофорез демонстрирует множественные полосы белка в неочищенном экстракте, несколько полос после фракционирования СА, и только одну полосу после выделения «пиковой» фракции гель-фильтрацией. В отдельных случаях (Monod & al., 1991) после гель-фильтрации целевой протеазе отвечает «главная» полоса, наряду с которой наблюдаются еще 1–2 «минорные» полосы.

Следует отметить, что рассмотренные протоколы нацелены на получение какого-то одного фермента с наибольшей протеолитической активностью. В то же время исследования в области геномики и протеомики показали, что, например, геном *A. fumigatus* кодирует 136 протеаз, из которых, по максимальным оценкам, секретируется до 100 ферментов (Watson & al., 2011).

ЛИТЕРАТУРА

1. Abidi F., Aissaoui N., Lazar S., Marzouki M.N. Purification and biochemical characterization of a novel alkaline protease from *Aspergillus niger*. Use in antioxidant peptides production // J. Mater. Environ. Sci. 2014. Vol. 5, No. 5. P. 1490–1499.
2. Calkins C.R., Sullivan G. Adding enzymes to improve beef tenderness // Beef Facts. Product Enhancement. 2007. P. 1–6. <http://www.beefresearch.org/factsheets1.aspx>
3. Chancharoonpong C., Hsieh P.-C., Sheu S.-C. Enzyme production and growth of *Aspergillus oryzae* S. on soybean koji fermentation // APCBEE Procedia. 2012. Vol. 2. P. 57–61.
4. Charles P., Devanathan V., Anbu P., Ponnuswamy M.N., Kalaichelvan P.T., Hur B.-K. Purification, characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10 // J. Basic Microbiol. 2008. Vol. 48, Is. 5. P. 347–352.
5. Chellapandi P. Production and preliminary characterization of alkaline protease from *Aspergillus flavus* and *Aspergillus terreus* // E-Journal of Chemistry. 2010. Vol. 7, No. 2. P. 479–482.
6. Devi M.K., Banu A.R., Gnanaprabhal G.R., Pradeep B.V., Palaniswamy M. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents // Indian J. Sci. Technol. 2008. Vol. 1, No. 7. P. 1–6.
7. Dixon M., Webb E.C. Enzymes. 2nd ed. New York: Academic Press, 1964. 950 pp.
8. Gnanadoss J.J., Robert R., Jebapriya G.R. Production of protease from *Aspergillus niger* and *Mucor mucedo* under submerged and solid state fermentation // Int. J. Curr. Res. 2011. Vol. 3, Is. 10. P. 75–78.
9. Hernández-Martínez R., Gutiérrez-Sánchez G., Bergmann C.W., Loera-Corral O., Rojo-Domínguez A., Huerta-Ochoa S., Regalado-González C., Prado-Barragán L.A. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus* // Process Biochem. 2011. Vol. 46, No. 10. P. 2001–2006.
10. Hong K., Yu J., Parmely M.J. Alkaline protease purified from *Aspergillus oryzae* prevents TNF- α -induced acute inflammation in the mouse small intestine // FASEB J. 2006. Vol. 20. A144. http://www.fasebj.org/cgi/content/meeting_abstract/20/4/A144
11. Hussain A., Mannan A., Zubair H., Mirza B. Purification and characterization of alkaline proteases from *Aspergillus terreus* // J. Chem. Soc. Pak. 2010. Vol. 32, No. 4. P. 497–504.
12. Index Fungorum. The Royal Botanic Gardens Kew, Mycology Section; Landcare Research–NZ, Mycology Group; Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science, State Key Laboratory of Mycology. <http://www.indexfungorum.org/names>. Accessed 29.08.2014.
13. Kalaskar V.V., Narayanan K., Subrahmanyam V.M., Rao V.J. Partial characterization and therapeutic application of protease from a fungal species // Indian Drugs. 2012. Vol. 49, No. 10. P. 42–46.
14. Klöcking H.P., Markwardt F. Thrombolytic and pharmacodynamic properties of *Aspergillus ochraceus* protease // Farmakol. Toksikol. 1975. Vol. 38, No. 3. P. 341–349.
15. Nigam A., Ayyagari A. Lab manual in biochemistry, immunology and biotechnology. New Delhi: Tata McGraw–Hill, 2007. 375 pp.

16. Madhumithah C.G., Krithiga R., Sundaram S., Sasikumar C.S., Guhathakurta S., Cherian K.M. Utilization of vegetable wastes for production of protease by solid state fermentation using *Aspergillus niger* // World J. Agric. Sci. 2011. Vol. 7, No. 5. P. 550–555.
17. Monod M., Togni G., Rahalison L., Frenk E. Isolation and characterisation of an extracellular alkaline protease of *Aspergillus fumigatus* // J. Med. Microbiol. 1991. Vol. 35. P. 23–28.
18. Mukhtar H., Haq I.–U. Production of acid protease by *Aspergillus niger* using solid state fermentation // Pakistan J. Zool. 2009. Vol. 41, No. 4. P. 253–260.
19. Munawar T.M., Swamy A.V.N., Varadacharyulu N.C. Production, purification and characterization of alkaline protease from *Aspergillus niger* MTCC281 by using agro industrial wastes under solid state fermentation // Int. J. Adv. Res. 2014. Vol. 2, Is. 5. P. 931–938.
20. Murthy P.S., Naidu M.M. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid–state fermentation utilizing coffee by–products // World Appl. Sci. J. 2010. Vol. 8, No. 2. P. 199–205.
21. Muthulakshmi C., Gomathi D., Kumar D.G., Ravikumar G., Kalaiselvi M., Uma C. Production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation // Jourdan J. Biol. Sci. 2011. Vol. 4, No. 3. P. 137–148.
22. Negi S., Banerjee R. Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor // Food Research International. 2009. Vol. 42, Is. 4. P. 443–448.
23. Negi S., Gupta S., Banerjee R. Extraction and purification of glucoamylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single–stage fermentation // Food Technol. Biotechnol. 2011. Vol. 49, No. 3. P. 310–315.
24. Neustadt M., Costina V., Kupfahl C., Buchheidt D., Eckerskorn C., Neumaier M., Findeisen P. Characterization and identification of proteases secreted by *Aspergillus fumigatus* using free flow electrophoresis and MS // Electrophoresis. 2009. Vol. 30, No. 12. P. 2142–2150.
25. Niyonzima F.N., More S.S. Purification and characterization of detergent–compatible protease from *Aspergillus terreus* gr. // 3 Biotech. 2014. doi:10.1007/s13205–014–0200–6
26. Oshima K. Protease and amylase of *Aspergillus oryzae* // Journ. Coll. Agr., Hokkaido Imp. Univ. 1928. Vol. 19, Pt. 3. P. 135–244.
27. Osman M.E., Khattab O.H., Elsaba Y.M. 2014. *Aspergillus terreus* proteases: characterization and applications // J. Chem. Bio. Phy. Sci. Sec. B, Biol. Sci. Vol. 4, No. 3. P. 2333–2346.
28. Rai M. (ed.). Advances in fungal biotechnology. New Delhi: I.K. International, 2009. 545 pp.
29. Rebecca L.J., Sharmila S., Das M.P., Samuel F.A. Production and analysis of protease from *Aspergillus niger* using fish scales as substrate // J. Chem. Pharm. Res. 2012. Vol. 4, No. 10. P. 4597–4600.
30. Species Fungorum. CABI databases. RBG Kew; ITIS. <http://www.speciesfungorum.org/Names/Names.asp>. Accessed 29.08.2014.
31. Watson D.S., Feng X., Askew D.S., Jambunathan K., Kodukula K., Galande A.K. Substrate specificity profiling of the *Aspergillus fumigatus* proteolytic secretome reveals consensus motifs with predominance of Ile/Leu and Phe/Tyr // PLoS One. 2011. Vol. 6, Is. 6. e21001. P. 1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0021001
32. Yin L.J., Hsu T.H., Jiang S.T. Characterization of acidic protease from *Aspergillus niger* BCRC 32720 // J. Agric. Food Chem. 2013. Vol. 61, No. 3. P. 662–666.